



Hinc patriam sustinet

Instituto Superior de Agronomia
Universidade Técnica de Lisboa

Avaliação da diversidade genómica de diferentes espécies do género *Avena*

Projecto
Licenciatura em Biologia

Ana Maria de Sousa Varela
Orientadora: Investigadora Manuela Gomes da Silva

Lisboa, 2011

AGRADECIMENTOS

Foi com o apoio de muitos entes queridos que sempre me apoiaram neste percurso, que este trabalho se concretizou. Nunca sem eles, teria chegado aqui, e por isso adianto-me já com um **sincero e caloroso obrigado...**

Quero agradecer em primeiro lugar, à pessoa que me orientou ao longo deste projecto, Prof^a Manuela Silva. Agradeço por todo o apoio, agradeço por toda a inteira disponibilidade que sempre mostrou em ajudar, agradeço por todos os e-mails que me mandou em resposta às palavras “estou perdida”, agradeço pela imensa paciência que sempre teve comigo, agradeço pela enorme compreensão que teve quanto às minhas ausências, e acima de tudo, agradeço por tudo o que me ensinou.

À Prof^a Wanda Viegas, por me ter sempre recebido no laboratório com um sorriso na cara.

Aos Eng^o José Carlos Costa, Eng^a Manuela Veloso, Eng^a Isabel Fernandes, pela gentil cedência do material.

À Diana Tomás e ao Miguel Bento, por todas as horas que comigo perderam a ensinar-me novas técnicas ou a repetir aquilo que eu já me tinha esquecido em momentos de confusão, e por toda a boa disposição que sempre transmitiram.

À Augusta pelo empurrão que me deu no início deste projecto.

À Dr^a Isabel Gonçalves, por ter sido sempre um pilar tão forte nesta minha caminhada.

Aos meus amigos, pelas alegrias, pelas gargalhadas, pelo apoio e pelos abraços que nunca estiveram em falta.

À Sara Fidalgo, pela imensa dedicação e empenho que sempre depositou nesta amizade, pelo apoio e pela boa disposição que sempre me transmite.

À Sofia Nogueira e à Sofia Abreu, que tanta alegria e conforto me dão no âmago deste fantástico trio que formamos, por serem sempre tão presentes, por todas as infintas conversas sobre tudo e mais alguma coisa, pela preciosa amizade que com tanto carinho guardo.

À Ana e ao Manuel, pela eterna e profunda amizade, pelo apoio incondicional, por todos os maravilhosos momentos que já passámos juntos, e por todo o tempo que me ouviram, sem nunca criticar.

A toda a minha família, por todo o amor e apoio que nunca deixaram que me faltasse.

Ao Yoda, por tantas vezes me ter confortado nos momentos mais complicados e por ser o exemplo do valor e impacto imensos que um animal pode ter numa pessoa.

Ao Victor e ao Rafael, pela amizade, pelos valiosos conselhos, pela presença e apoio, e por tantos bons momentos que passámos.

À minha querida tia Anita, por toda a disponibilidade e prontidão que sempre mostra em ajudar-me e pelo apoio imenso que tão importante é para mim.

Aos meus avós, por serem sempre tão doces e carinhosos, e por me terem ensinado tanta coisa, fazendo de mim quem eu sou hoje.

À minha mana e às minhas sobrinhas lindas, por toda a força e por todo o carinho que mesmo à distancia não deixaram de cá chegar.

À minha mãe, por todas as palavras bonitas e confortantes que tem o dom de dizer em momentos mais difíceis, por todos os abraços incondicionais e tão calorosos que sempre me deu, por ser a melhor mãe que eu podia ter.

Ao meu pai, por todos os abraços apertados que sempre me deu, por ter sempre acreditado tanto em mim e nas minhas capacidades, por se ter interessado tanto por este meu trabalho colocando-me sempre questões que me põem a pensar, e por ser aquele que me mostra a imensidão do quanto eu ainda tenho de aprender.

Ao **João Gaspar**, meu grande companheiro, minha fonte de força e alegria, que acreditou sempre em mim, que esteve sempre presente nos bons e maus momentos, que tantas vezes me disse “tenho orgulho em ti”, e que mesmo à distância de milhares de quilómetros fez sempre o máximo para que essa distância não se sentisse.

RESUMO

As espécies hexaplóides de *Avena* - *A. sterilis* e *A. sativa*, são interférteis e o resultado do seu cruzamento é um híbrido natural que apresenta características vantajosas. Com o objectivo de estudar a diversidade intra (diferentes linhas de *A. sativa*) e interespecífica (entre *A. sativa* e *A. sterilis*) e o híbrido *A. sativa* x *A. sterilis* comparativamente com as espécies parentais procedeu-se à análise citogenética e molecular destas espécies.

A caracterização citogenética efectuada, recorrendo a técnicas de hibridação *in situ* fluorescente (FISH), permitiu confirmar a presença de seis *loci* de rDNA em *A. sativa*, como anteriormente descrito, e sugere que cada *locus* de rDNA apresenta em interfase uma região condensada. Relativamente a *A. sterilis*, espécie em que o mapeamento do rDNA nunca tinha sido efectuado, o número de *loci* de rDNA detectado é superior ao observado em *A. sativa*.

A caracterização molecular das referidas espécies de *Avena*, efectuada relativamente a sequências flanqueadoras de microsatélites e retrotransposões, demonstrou claramente que os referidos marcadores moleculares não só são excelentes ferramentas para caracterizar genómicamente diferentes espécies do género *Avena*, bem como diferentes linhas de *A. sativa*, como demonstram pela primeira vez a ocorrência de reestruturações genómicas no híbrido.

Palavras-chave: *Avena*, poliplóidia, rDNA, microsatélites e retrotransposões.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	III
ÍNDICE	IV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Evolução do género <i>Avena</i>	1
1.2 Poliplóidia	2
1.3 Sequências repetitivas	3
1.4 Objectivos	4
2. MATERIAIS E MÉTODOS	4
2.1 Material Vegetal	4
2.2.1 Germinação das sementes	5
2.2.2 Recolha, tratamento e fixação das raízes	5
2.2.3 Esfregaços de ápices radiculares	6
2.2.4 Marcação da sonda por “Nick Translation”	6
2.2.5 Hibridação <i>In Situ</i> Fluorescente (FISH)	7
2.2.6 Observação, captação e tratamento de imagem	9
2.2.7 Extracção de DNA do material foliar	9
2.2.8 IRAP e REMAP	9
2.2.9 Electroforese, captação e tratamento de imagem	10
3. RESULTADOS	10
3.1 Análise citogenética	10
3.2 Análise molecular – IRAP e REMAP	13
4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	16
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
6. ANEXO 1	21

Avaliação da diversidade genómica de diferentes espécies do género *Avena*

1. INTRODUÇÃO

A aveia foi pela primeira vez descrita por Tournefort no início do século XVIII, tendo mais tarde Lineu (1753) descrito quatro espécies do género *Avena* L., como a *A. sterilis* e a *A. sativa*, e iniciado uma classificação rudimentar que diferenciava as espécies de aveia como sendo selvagens ou cultivadas (Coffman, 1977). A aveia pertence à família Poaceae, subfamília Pooideae e género *Avena* (Clayton & Renvoize, 1986). Este género é ideal para a investigação da organização e evolução dos genomas em espécies poliplóides, uma vez que inclui espécies com diferentes graus de poliplóidia e composição genómica variada (Linares *et al*, 2000).

O número básico de cromossomas do género *Avena* L. é $x=7$, compreendendo espécies com três níveis de poliplóidia: diplóides ($2n=2x=14$ cromossomas, genomas AA e CC), tetraplóides ($2n=4x=28$ cromossomas, genomas AABB e AACC) e hexaplóides ($2n=6x=42$ cromossomas, genoma AACCCDD) (Katsiotis *et al*, 2000). São exemplos de espécies diplóides a *A. strigosa* e a *A. pilosa*, de espécies tetraplóides a *A. barbata* e a *A. wiestii* e de espécies hexaplóides a *A. sterilis* e a *A. sativa*. Apenas os genomas A ou C existem em condição diplóide e o genoma B apenas se encontra na forma tetraplóide (Linares, Ferrer, Fominaya, 1998). Assim, as diferentes espécies de *Avena* partilham o(s) seu(s) genoma(s) entre si e presume-se que algumas sejam os ancestrais de outras.

1.1 Evolução do género *Avena*

A origem da aveia cultivada perdeu-se na antiguidade. O trigo e a cevada foram inicialmente mais importantes para o Homem do que a aveia e existem evidências de que este cereal persistiu como planta invasora durante séculos. Contudo, pensa-se que o género *Avena* L. tenha surgido na Ásia Menor ou no norte de África, e o avanço para ambientes mais frios e húmidos levou a que se reunissem condições propícias ao desenvolvimento da cultura da aveia. Simultaneamente ocorreram alterações genéticas importantes que constituem vantagens selectivas ao cultivo, como a perda da debulha natural do grão e da dormência (revisto em Tavares, Zanettini, Carvalho, 1993). Actualmente, a aveia é considerada um dos principais cereais cultivados, possuindo uma adaptação ecológica mais ampla do que o trigo e a cevada, nomeadamente em climas húmidos e mediterrânicos (Holden, 1979).

A evolução do género *Avena* L. envolveu os dois genomas principais, A e C, sendo os outros seus derivados. Vários estudos provaram que o genoma C se encontra em todos os níveis de plóidia quase inalterável, sendo as espécies que possuem este genoma morfologicamente muito primitivas, pelo que é considerado um dos genomas básicos em aveia. Por seu lado, o genoma A desenvolveu-se independentemente do genoma C, dando origem a diversas variantes - As, Al, Ad, Ap e Ac – que correspondem aos genomas das espécies *A. strigosa*, *A. longiglumis*, *A. damascena*, *A. prostrata* e *A.*

canariensis, respectivamente. O genoma C é bastante diferente dos genomas A e D, que por sua vez são semelhantes entre si (Loskutov, 2008).

As espécies de aveia com maior interesse, sobretudo do ponto de vista económico, são hexaplóides ($2n=6x=42$). Como mencionado acima, tanto a *A. sativa* como a *A. sterilis* são hexaplóides ($2n = 42$) e englobam no seu núcleo 3 genomas diferentes (AACCDD) (Tavares, Zanettini, Carvalho, 1993). A *A. sterilis*, que teve origem no continente Asiático (Coffman, 1977), é das espécies com distribuição geográfica mais ampla, sobrepondo-se mesmo aos seus ancestrais diplóides e tetraplóides, o que sugere que será o tipo hexaplóide básico a partir do qual os outros evoluíram. Esta hipótese é reforçada por Nishiyama *et al.* (1989), através de dados obtidos com cruzamentos entre diferentes espécies hexaplóides e espécies diplóides e tetraplóides. Nos híbridos envolvendo *A. sterilis* foi encontrado maior número de bivalentes do que quando outros hexaplóides foram utilizados. Estes dados sugerem a ocorrência mais frequente de emparelhamento dos cromossomas das espécies diplóides e tetraplóides com os cromossomas de *A. sterilis* (Tavares, Zanettini, Carvalho, 1993).

Apesar das diferenças morfológicas e ecológicas ao nível hexaplóide, as espécies são todas interférteis, significando que o cruzamento entre a *A. sterilis* e a *A. sativa* resulta em descendência fértil. A hibridação interespecífica pode ser utilizada para transferência de genes com características agrónomicas importantes com o objectivo de melhorar espécies importantes economicamente (Tavares, Zanettini, Carvalho, 1993). O cruzamento entre *A. sterilis* subsp. *sterilis* e *A. sativa* ocorre naturalmente e apresenta interesse agrónómico por produzir maior número de sementes do que a variedade de *A. sativa* parental (Costa *et al.*, 2000). Em cruzamentos deste tipo, em que se pretende a transferência de caracteres de uma espécie selvagem para uma cultivada, uma questão importante é quanto do genoma da espécie selvagem pode ser introduzido sem ocasionar distúrbios no genoma adaptado da espécie cultivada. Estima-se que nos híbridos referidos o genoma de *A. sterilis* poderá ser tolerado até 12%, obtendo-se assim tipos morfológicamente aceitáveis (Tavares, Zanettini, Carvalho, 1993).

1.2 Poliplóidia

A poliplóidia é um processo evolutivo que resulta da reunião de dois ou mais genomas no mesmo núcleo. Este fenómeno é considerado de grande importância na evolução e especiação das plantas, sendo igualmente utilizado como uma ferramenta em programas de melhoramento de plantas (Ranney, 2006).

Existem dois tipos de poliplóidia, a autopoliplóidia que envolve a duplicação de genomas que provêm da mesma espécie e a alopoliplóidia que resulta da união de genomas de espécies diferentes (Ranney, 2006). Apesar de ser muito raro nos mamíferos, em plantas existem inúmeros exemplos de poliplóidia. A poliplóidia é responsável pelo surgimento de plasticidade genotípica, permitindo uma maior tolerância a variações genómicas que os seus progenitores diplóides. Os organismos poliplóides estão sujeitos a grande stress genético, que poderá levar a várias modificações genéticas e epigenéticas. As alterações genéticas incluem translocações e transposições, bem como deleções e inserções de

sequências, enquanto as alterações epigenéticas podem ser responsáveis pela regulação génica não aditiva, transcrição de transposões, silenciamento ou sub-funcionalização de genes homólogos e condensação da cromatina (Chen & Ni, 2006; Viegas *et al*, 2002).

São vários os factores que proporcionam aos poliplóides vantagens adaptativas evolutivas. Por um lado, os indivíduos poliplóides são heterozigóticos o que pode ser decisivo no crescimento, desempenho e adaptabilidade de espécies poliplóides. Por outro lado, uma vez que todos os poliplóides possuem uma certa redundância genética, cópias extra dos genes podem divergir e sofrer mutações, levando ao surgimento de novas características sem comprometer as funções essenciais (Ranney, 2006). Assim, os organismos poliplóides podem produzir todas as enzimas produzidas por cada um dos parentais, bem como novas formas enzimáticas. Esta multiplicidade enzimática fornece aos poliplóides flexibilidade bioquímica e a possibilidade de se desenvolverem em ambientes não ocupados pelas espécies parentais (Roose & Gottlieb, 1976).

As implicações genómicas e epigenéticas da poliplóidização têm sido investigadas em espécies de cereais como o trigo e *triticale*, que partilham uma origem monofilética. Embora estudos filogenéticos e moleculares tenham demonstrado grandes diferenças no tamanho do genoma entre os cereais, a sintenia e o número de genes são bastante conservados sendo a colinearidade genómica quebrada por vezes por translocações cromossómicas (revisto em Bento *et al*, 2008). Em Bento *et al* (2008), foram estudados rearranjos genómicos em *triticale*, utilizando as técnicas IRAP, REMAP e ISSR. Foi feita uma análise bastante abrangente de retrotransposões e microsátélites, desvendando rearranjos no DNA induzidos pela poliplóidização, medidos pela ausência de um perfil aditivo das bandas parentais em *triticale*. Dez combinações diferentes de *primers* foram utilizadas na execução das três técnicas, sendo que nove destas dez combinações revelaram rearranjos do genoma. É assim descrito um valor total de 51% de rearranjos no DNA, englobando eliminação de bandas parentais (43%) e aparecimento de novas bandas (7%), evidenciando claramente a tendência para haver alterações genómicas resultado do stress induzido pela poliplóidização.

1.3 Sequências repetitivas

Os cromossomas dos eucariotas superiores são compostos por um elevado número de sequências repetitivas de DNA, que desempenham um papel importante na divergência dos genomas (Harding, 1992).

Microsátélites, ou *Simple Sequence Repeats* (SSRS), são *loci* polimórficos presentes no DNA nuclear e consistem em unidades repetidas de 1-6 pares de bases de extensão. Geralmente são neutros, co-dominantes e encontram-se vastamente dispersos por todo o genoma (Bento *et al*, 2008). Por seu lado, os retrotransposões, principais constituintes dos genomas vegetais, são elementos do DNA móveis, que contêm sequências longas, definidas e conservadas e que se replicam através de transcrição reversa seguidas da reinserção das novas cópias de cDNA no genoma (Adams *et al*, 1987). São agrupados em duas classes, Ty1/*copia* e Ty3/*gypsy*, de acordo com a ordem dos seus domínios codificantes para

proteínas encontrados entre as suas extremidades, *long terminal repeats* (LTRs). A maior diferença entre as duas classes é a localização do domínio que codifica a integrase (IN) em relação ao domínio que codifica a transcriptase reversa (Miller *et al*, 1998). Devido à sua dinâmica e mobilidade, estes elementos facilmente originam modificações moleculares e aumento do genoma, tendo assim um importante papel na evolução e especiação dos genomas (Bennet & Smith, 1976).

Os genes ribossomais possuem três principais características: (i) ocorrem repetidamente ao longo do genoma, sendo que o seu número de cópias pode variar em centenas ou milhares por cada genoma haplóide, (ii) encontram-se geralmente agrupados em determinadas localizações do genoma, (iii) representam duas das famílias mais conservadas de sequências repetitivas em plantas (Linares *et al* 1996). A análise da distribuição e organização das sequências de DNA ribossomal (rDNA) é importante para entender acontecimentos de divergência e hibridação entre espécies. Estes genes ribossomais estão organizados em duas grandes famílias. A maior destas duas famílias contém o rDNA 45S, que engloba as sequências que codificam para os rRNAs 18S-5.8-26S, enquanto a outra família mais pequena, corresponde ao rDNA 5S. Em regra, o rDNA 45S encontra-se localizado em regiões chamadas NORs (*nucleolus organizing regions*), sendo estas identificadas em dois pares de cromossomas nas espécies diplóides e tetraplóides, e três pares nas espécies hexaplóides do género *Avena*. Em *A. sativa*, estão descritos NORs nos cromossomas 12A, 3D e 13D (Irigoyen *et al* 2002). Contudo, em algumas células metafásicas são visíveis oito locais de hibridação *in situ* fluorescente obtidos com a sonda pTa71, que surgem nos braços curtos de quatro cromossomas e nos braços longos de outros quatro cromossomas (Linares *et al*, 1996). Por seu lado, estão descritos doze *loci* de rDNA 5S em *A. sativa*, oito localizados em cromossomas portadores de NORs, especificamente nos cromossomas 12A e 3D, e quatro localizados nos braços longos de dois pares de cromossomas submetacêntricos. (Linares *et al* 1996, Irigoyen *et al* 2002).

1.4 Objectivos

É objectivo deste trabalho estudar comparativamente diferentes espécies do género *Avena* – duas linhas de *A. sativa*, *A. sterilis* e um híbrido resultante do cruzamento destas duas espécies - utilizando marcadores moleculares e hibridação *in situ* fluorescente.

Será avaliada a diversidade de sequências flanqueadoras de retrotransposões e microssatélites, utilizando metodologias de PCR. Por outro lado, será realizado o mapeamento cromossómico e analisada a organização interfásica de sequências de rDNA 45S.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

As sementes do material utilizado tiveram diferentes proveniências: (1) *A. sativa* linha 2424 (2n=6x=42, AACCCDD) e híbrido resultante do cruzamentos *A. sativa* x *A. sterilis* (recolhidas de

semente de agricultor na ilha da Madeira, gentilmente cedidas pela Eng^a Manuela Veloso, Instituto Nacional de Recursos Biológicos, INIA Quinta do Marquês), tendo o genótipo híbrido sido identificado pelo Eng^o José Carlos Costa (Costa *et al*, 2000); (2) *A. sativa* S. Eulália (2n=6x=42, AACCCDD) (gentilmente cedidas pela Eng^a Isabel Fernandes, Direcção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural, Tapada da Ajuda); (3) *A. sterilis* (2n=6x=42, AACCCDD) colhidas em Elvas e gentilmente cedidas pelo Eng^o José Carlos Costa, ISA-UTL.

2.2 Métodos

2.2.1 Germinação das sementes

Procedeu-se à esterilização das sementes numa solução de lixívia 5% durante 5 minutos com agitação, seguida de uma lavagem de 10 minutos em água corrente antes da sua germinação. Posteriormente as sementes de todos os genótipos foram colocadas em caixas de Petri com papel de filtro humedecido com água destilada, envoltas em alumínio para evitar a entrada de luz, e submetidas a um tratamento de cerca de 3 dias a 4°C, para sincronizar a germinação. Seguidamente, as sementes foram colocadas numa câmara de crescimento, com um fotoperíodo de 16h/dia a 22°C e 8h/noite a 15°C.

Análise citogenética

2.2.2 Recolha, tratamento e fixação das raízes

Após cerca de uma semana, depois das sementes terem sido transferidas para a câmara de crescimento, foram colhidas individualmente raízes de cada plântula dos diferentes genótipos para o estudo citogenético. Os ápices radiculares foram retirados com uma pinça e foram colocados imediatamente em gelo fundente durante 24h. Este tratamento tem como objectivo despolimerizar os microtubulos por forma a obter células c-metafásicas. Após as 24h as raízes foram fixadas em etanol acético 3:1 (v/v) com agitação e renovando o fixador várias vezes. Ao fim de cerca de 24h, o fixador foi renovado uma última vez e as raízes foram guardadas a -20°C.

As plântulas foram depois repicadas para *Jiffy Pots*, onde se mantiveram durante cerca de 1 semana tendo sido por fim transferidas para vasos. As plantas foram posteriormente mantidas em estufa e regadas 1 a 2 vezes por semana.

Foram igualmente colhidas raízes de plantas adultas com cerca de 4 semanas. Para isso, retiram-se cuidadosamente as plantas dos vasos de forma a que as raízes fiquem expostas. Depois de lavadas, para retirar os vestígios de terra, as raízes foram submetidas ao mesmo tratamento em gelo e posterior fixação.

2.2.3 Esfregaços de ápices radiculares

Para fazer esfregaços de ápices radiculares é necessário proceder a uma digestão enzimática. Para tal, lavaram-se as raízes em solução tampão 1xEB¹ com agitação durante 5 minutos. De seguida renovou-se o tampão e deixou-se a agitar durante mais 5 minutos, de forma a garantir que o fixador foi todo removido. Seguidamente retirou-se a solução tampão e adicionou-se a solução enzimática², incubando a 37°C durante 1 hora e 45 minutos. Findo este período, retirou-se a solução enzimática e adicionou-se solução tampão 1xEB.

Os esfregaços foram realizados à lupa em ácido acético a 60% dispersando o material com o auxílio de agulhas histológicas. Depois de se colocar a lamela e retirar o excesso de ácido com papel de filtro, foram aplicadas pancadas secas verticalmente sobre a zona do esfregaço com uma agulha de modo a desfazer o citoplasma e separar as células. Por fim, os esfregaços obtidos foram observados ao microscópio e às lâminas que apresentavam núcleos e c-metáfases separadas e com pouco citoplasma, foram-lhes retiradas as lamelas utilizando CO₂, deixando a secar ao ar.

2.2.4 Marcação da sonda por “Nick Translation”

A sonda pTa71 foi marcada com digoxigenina por “Nick Translation”, técnica que se baseia na actividade das enzimas DNase I e DNA polimerase I (Sambrook *et al.*, 1989) e permite a incorporação de deoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs), marcados e não marcados, em cadeias duplas de DNA. A DNase I é uma endonuclease que hidrolisa cadeias de DNA duplas ou simples, preferencialmente em locais adjacentes a nucleótidos de pirimidinas, resultando em cortes ("nicks") em vários locais das cadeias. A DNA polimerase I permite a adição de nucleotídeos à extremidade 3' das cadeias de DNA disponibilizadas pelos cortes da DNase I. Devido à actividade exonucleolítica 5' para 3' da DNA polimerase I, os nucleotídeos da extremidade 5' dos cortes são removidos, sendo posteriormente substituídos quando a extremidade 3' atinge esse ponto da cadeia, o que resulta num movimento de síntese de DNA ao longo da cadeia molde. Este método permite a marcação de fragmentos de DNA clonados em plasmídeos sem estes serem excisados do vector, sendo marcado tanto o plasmídeo como o fragmento clonado.

Para a realização da *Nick Translation* recorreu-se ao kit “Nick Translation Kit”³. A mistura de reacção para a “Nick Translation” preparada num tubo de 1,5ml, sendo os reagentes e as quantidades utilizados indicados na seguinte Tabela 1.

¹ 1xEB: Ácido cítrico monohidratado 0,1 M; B – Citrato trissódico desidratado 0,1 M; 10xEB: adicionar na proporção 2:3 (A:B); diluir 1:10 em água destilada para obter 1xEB.

² Solução enzimática: 0,3% (p/v) celulase R10, 0,3% pectoliase Y-23 e 0,25% citohelicase (v/v), 0,03% EDTA em 2 x SSC, pH 4.2.

³ Nick Translation Kit: Roche, Version 19. Cat. No. 10 976 776 001.

<i>Reagente</i>	<i>Volume</i>
1µg DNA template em ddH ₂ O	12µ = xµl de DNA + yµl de H ₂ O
5x dNTP Mix	4µl
Nick translation mix	4µl

Tabela 1. Mistura de reacção para marcação de sondas por “NickTranslation”

A mistura de reacção foi incubada durante 90 minutos a 15°C, e para parar a reacção adicionou-se 5µl de EDTA 0,1 M (pH 8.0).

2.2.5 Hibridação *In Situ* Fluorescente (FISH)

A Hibridação *In Situ* Fluorescente é uma técnica citogenética fundamental que permite a identificação de sequências específicas em células ao longo de todo o ciclo celular. Esta técnica baseia-se na complementaridade da dupla cadeia de DNA, permitindo hibridar uma sequência alvo de DNA com uma sonda específica complementar. Exemplos da sua aplicação são o mapeamento cromossómico de sequências de DNA ou o estudo de alterações evolutivas na organização física do genoma (Noletto *et al*, 2006).

Foram usadas as seguintes sondas: rDNA 45S (3 fragmentos de rDNA: 2 localizados no 25S e 1 localizado no 18S, numa mistura de proporção 1:1:1) produzida a partir do plasmídeo pTa71 (Gerlach & Bedbrook, 1979), com 3 pares de *primers*; rDNA 5S, produzida a partir do plasmídeo pTa794 (Garlach & Dyer, 1980).

Anteriormente à hibridação, procedeu-se aos pré-tratamentos das lâminas, de modo a reduzir as possíveis interacções entre as sondas e componentes celulares e facilitar a acessibilidade das sondas e reagentes de detecção. Inicialmente, fez-se uma fixação com formaldeído 4% MTSB (50µl/lâmina) durante 30 minutos, para garantir a fixação do material celular, seguido de uma lavagem com detergente 2xSSC⁴ e incubação em câmara húmida a 37°C com solução de pepsina⁵ durante 10 minutos, para a digestão do citoplasma e fracção proteica do DNA. Segue-se uma lavagem com 2xSSC para remoção da pepsina e tratamento com solução de RNase⁶ a 37°C durante 1 hora, de forma a retirar o RNA, uma vez que se pretende efectuar hibridação DNA:DNA. Posteriormente procedeu-se a lavagens com 2xSSC (3x5 minutos) e fez-se nova fixação com formaldeído 4% MTSB durante 10 minutos. De seguida, as lâminas foram lavadas com 2xSSC e desidratadas com etanol a 70% (v/v) durante 3 minutos e etanol 100% por mais 3 minutos, deixando secar ao ar durante pelo menos 30 minutos.

Seguidamente procedeu-se à preparação da mistura de hibridação, como descrito na Tabela 2.

⁴ Saline Sodium Citrate: 0.3 M NaCl, 0.03 M citrato de sódio em água destilada, ajustar a pH 7,0.

⁵ Pepsina (actividade 3.200-4.500 unidades/mg de proteína) – Solução “stock” de 500 µg/ml em 0,01 M HCl. Usar uma diluição 1:75 em 0,01 M HCl.

⁶ RNase – Solução “stock” 10 mg/ml em 10 mM Tris.HCl, pH 8, preparada a partir de ribonuclease A, solução em 10 mM Tris.HCl, pH 8 e 50% glicerol. Usar 100mg/ml diluindo 1/100 em 2xSSC.

Para promover a desnaturação da mistura de hibridação, esta é aquecida a 90°C durante 10 minutos, sendo depois colocada em gelo durante 5 minutos, para evitar renaturação.

Foram adicionados 40µl da mistura a cada lâmina, cobrindo a região da preparação com uma lamela de plástico. As lâminas foram então colocadas no termociclador e submetidas a um programa que promove a desnaturação a 78°C, durante 10 minutos, seguida de uma descida gradual da temperatura até 37°C, temperatura a que são mantidas as lâminas durante a noite, em câmara húmida.

<i>Soluções</i>	<i>µl/lâmina</i>
Formamida a 100%	16
20xSSC	1
SDS 10%	0.5
DNA de esperma de salmão (5 µg/µl)	1
Sonda	y*
Sulfato de dextrano 50%	8
H ₂ O	3.5

Tabela 2: componentes da mistura de hibridação e respectivas quantidades.

*O valor utilizado para a sonda (y) varia com a sonda que está a ser utilizada.

No dia seguinte, as lâminas foram sujeitas a uma série de lavagens pós-hibridação da seguinte forma: 2xSSC, 10 minutos a 42°C; formamida a 20% (10ml de formamida para 40ml de 0,1xSSC), 10 minutos a 42°C; 2xSSC, 2x5 minutos a 42°C; 2xSSC, 2x5 minutos a temperatura ambiente: 4xSSC/*Tween*⁷, 2x5 minutos à temperatura ambiente. A lavagem com formamida a 20% corresponde a uma estringência de 85%.

Posteriormente foi usada uma solução de BSA 5%⁸, durante 5 minutos à temperatura ambiente para bloquear os locais que interferem com o anticorpo utilizado na detecção das sondas. Em seguida, é colocada 50µl/lâmina da mistura de detecção, que contém BSA 5% e anti-digoxigenina conjugada com fluoresceína (1:20, excitação no azul, emissão no verde amarelado) que irá detectar as sondas marcadas com digoxigenina, 1 hora em câmara húmida a 37°C. No final, as lâminas foram lavadas em 4xSSC/*Tween*, 3x5 minutos.

Por último, as lâminas foram sujeitas à coloração por DAPI⁹, um composto com uma grande afinidade para o DNA com emissão no azul. Para tal, foram colocados 7µl de DAPI em citifluor¹⁰ na zona do esfregaço, colocando por fim uma lamela de vidro e removendo o excesso com o auxílio de papel de filtro.

⁷ 4xSSC 0,2% (v/v) Tween 20 - Preparação de 500 ml: fazer uma diluição 1:5 de 20xSSC em água, adicionar 1 ml de Tween 20 e misturar bem devido à sua viscosidade.

⁸ Solução de BSA 5% - Albumina de soro de bovino (BSA, B-8894, fracção V isenta de globulina, Sigma) em 4xSSC/Tween.

⁹ DAPI (dihidrocloreto de 4', 6-diamino-2-fenilindole), solução de 2 µg/ml.

¹⁰ Citifluor AF1 – Solução glicerol/PBS redutora da dissipação de fluorescência.

2.2.6 Observação, captação e tratamento de imagem

As imagens foram observadas no microscópio de epifluorescência Zeiss AxioImager Z1. A captação de imagens foi realizada com o programa axiovision 4.5 e com a câmara digital Zeiss, modelo Axio Cam MRc5. O tratamento de imagens foi efectuado com o programa Adobe Photoshop versão 7.0.

Análise molecular

2.2.7 Extracção de DNA do material foliar

Folhas novas e saudáveis de plantas adultas com cerca de 4 semanas foram colhidas, envolvidas individualmente em alumínio e colocadas em azoto líquido para um congelamento instantâneo. Por fim, todas as amostras foram guardadas a -80°C até posterior utilização.

Para a extracção de DNA a partir do material foliar recorreu-se ao kit “Citogene DNA Purification Kit” da Citomed¹¹. O protocolo consiste nos seguintes passos: juntar num almofariz azoto líquido e 10-30mg do material congelado, mexer cuidadosamente e triturar rapidamente as folhas até ficarem em pó. Adicionar 300µl de *cell lysis* ao tecido foliar e incubar a 65°C durante 60 minutos. Adicionar 1.5µl de RNaseA ao lisado celular, agitar no vortex e incubar a 37°C durante 15 minutos. Colocar as amostras à temperatura ambiente, adicionar 100µl de *Protein Precipitation*, homogeneizar as amostras no vortex durante 20 segundos e centrifugar a 13,000-16,000 x g durante 3 minutos. O precipitado de proteínas será visível no fundo dos tubos, formando um *pellet* verde. Recuperar o sobrenadante contendo o DNA, adicionar 300µl de isopropanol 100%, misturar as amostras invertendo cuidadosamente os tubos para evitar partir o DNA e centrifugar a 13,000-16,000 x g durante 1 minuto. Em princípio o DNA será visível, formando um *pellet* que varia entre o branco e o verde claro. Verter o sobrenadante e secar o tubo em papel absorvente. Adicionar 300µl de etanol 70% e inverter os tubos várias vezes para lavar o *pellet* de DNA. Centrifugar mais uma vez a 13,000-16,000 x g durante 1 minuto e com cuidado remover o etanol. Inverter os tubos e deixar secar por completo o etanol, em cima de papel absorvente, durante 10-15 minutos. Por fim, ressuspender as amostras de DNA em 50µl de *DNA Hydration* durante a noite à temperatura ambiente.

2.2.8 IRAP e REMAP

Os marcadores IRAP (*Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism*) são utilizados para amplificar sequências situadas entre LTRs dos retrotransposões alvo. Os marcadores REMAP (*Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism*) utilizam os *primers* para LTR assim como para SSR, podendo amplificar sequências situadas entre retrotransposões, bem como entre microsatélites ou entre LTRs e SSRs (ANEXO 1, Bento *et al*, 2008).

¹¹ Citogene® DNA Cell&Tissue Kit. Ref^o: CCT-0150; Lot.: 6k780.

As reacções de IRAP e REMAP foram realizadas tal como descritas em Kalendar *et al* (1999), sendo que para cada reacção de 50µl foram utilizados: 10µl de DNA, 1.5µl de MgCl₂, 5µl de *buffer* 10xPCR, 0.5µl de dNTP's, 0.5µl de *Taq Polymerase*, 31.5µl de H₂O, e 0.5µl *primer Nikita* (5'-CGCTCCAGCGGTACTGCC) ou 0.5µl de *primer* (GT9)C, (5'-GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTC) (REMAP) e 1µl de *primer Nikita* (IRAP).

A amplificação decorreu em tubos de 0.2ml em termociclador com o seguinte programa: um passo a 94°C, 2min; um ciclo a 94°C, 30s; um ciclo a 50°C, 1min 30s; rampa + 0.5 °C até 72°C; 30 ciclos a 72°C, 2min; um passo a 72°C, 10min; 14°C.

2.2.9 Electroforese, captação e tratamento de imagem

Os produtos de PCR obtidos foram analisados por electroforese em gel de agarose 1% submetido a uma corrente de 70-90 volts durante 1-3h e detectados por coloração com brometo de etídio. Os géis foram por fim observados e fotografados usando o programa BioRad GEL DOC 2000. O tratamento de imagens foi efectuado com o programa Adobe Photoshop versão 7.0.

As bandas de DNA foram identificadas usando os seguintes critérios: (i) bandas monomórficas: comuns em ambas as espécies parentais (*A. sativa* e *A. sterilis*); (ii) bandas polimórficas: observadas apenas numa das espécies parentais; (iii) bandas poliplóides esperadas: bandas que se espera observar, resultado de um perfil aditivo das bandas características de ambas as espécies parentais; (iv) bandas poliplóides conservadas: bandas parentais detectadas no híbrido; (v) bandas poliplóides rearranjadas: bandas parentais ausentes no híbrido, tal como as novas bandas observadas exclusivamente no híbrido.

3. RESULTADOS

3.1 Análise citogenética

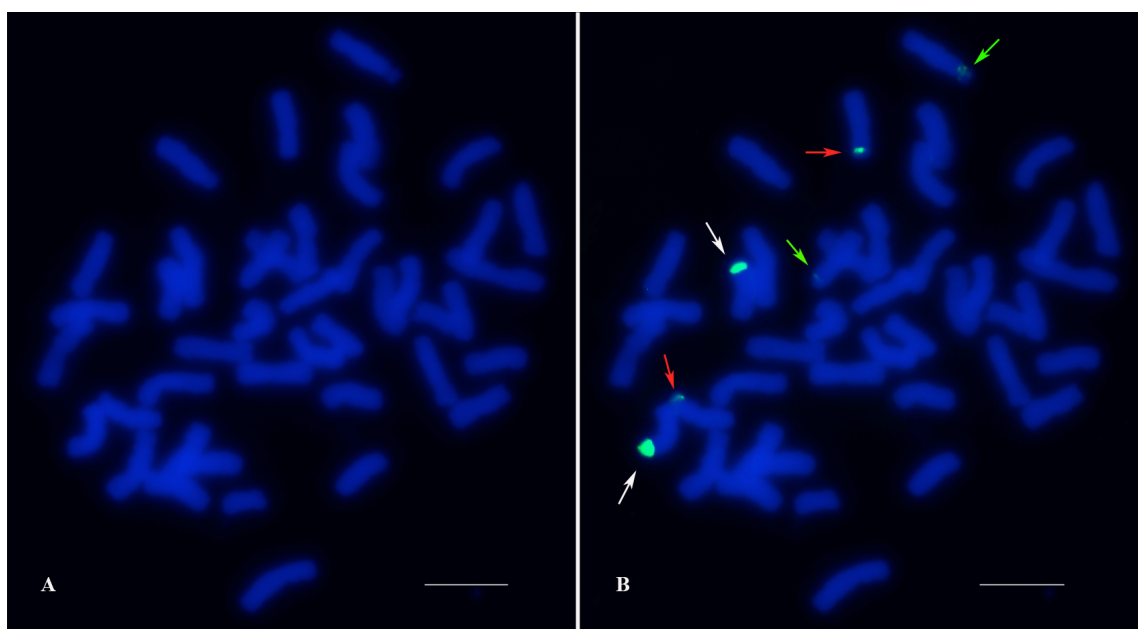
Pretende-se com a análise citogenética determinar o número de NORs observados em células metafásicas de *A. sativa* e *A. sterilis*, e avaliar a organização do rDNA 45S em núcleos interfásicos. Apenas foi possível efectuar essa análise utilizando a técnica FISH com a sonda pTa71 marcada com digoxigenina (detectada com fluoresceína, verde), em células do ápice radicular de *A. sativa* 2424 e *A. sterilis*.

Na Figura 1, está representada uma célula metafásica de *A. sativa* 2424 com pTa71 marcada com digoxigenina (B), e a respectiva coloração com DAPI (A). Nas imagens é possível observar a totalidade dos cromossomas de *A. sativa* (2n=6x=42), estando assinalados na imagem B os NORs encontrados, com setas de diferentes cores indicando cada par.

Relativamente à organização interfásica do rDNA em *A. sativa*, na maioria dos núcleos interfásicos analisados foram detectados apenas 5 ou 6 sinais condensados *in situ*. Na Figura 1D, podem observar-se três núcleos interfásicos de *A. sativa* 2424, apresentando dois núcleos com 6 marcações de *in situ* e um

com 5 marcações de rDNA. Na maioria dos núcleos interfásicos em que apenas se observaram 5 ou 6 marcações *in situ*, não foi possível detectar regiões descondensadas da cromatina ribossomal. No entanto, em alguns casos conseguem-se observar regiões nitidamente descondensadas dos NORs, como se pode observar na Figura 1F.

Em *A. sterilis*, foram detectáveis 6 NORs grandes em células metafásicas, tal como em *A. sativa*, tendo sido ainda detectado um NOR de menores dimensões, como se pode observar na Figura 2B. No entanto, a observação de células prometafásicas, como a apresentada na Figura 2D, parece indicar ainda a presença de um quinto par de NORs. É possível verificar também que a zona condensada do NOR apresenta uma localização proximal relativamente ao centrómero, como se pode observar por exemplo no NOR que se encontra assinalado na célula prometafásica (Figura 2D) no canto superior esquerdo.



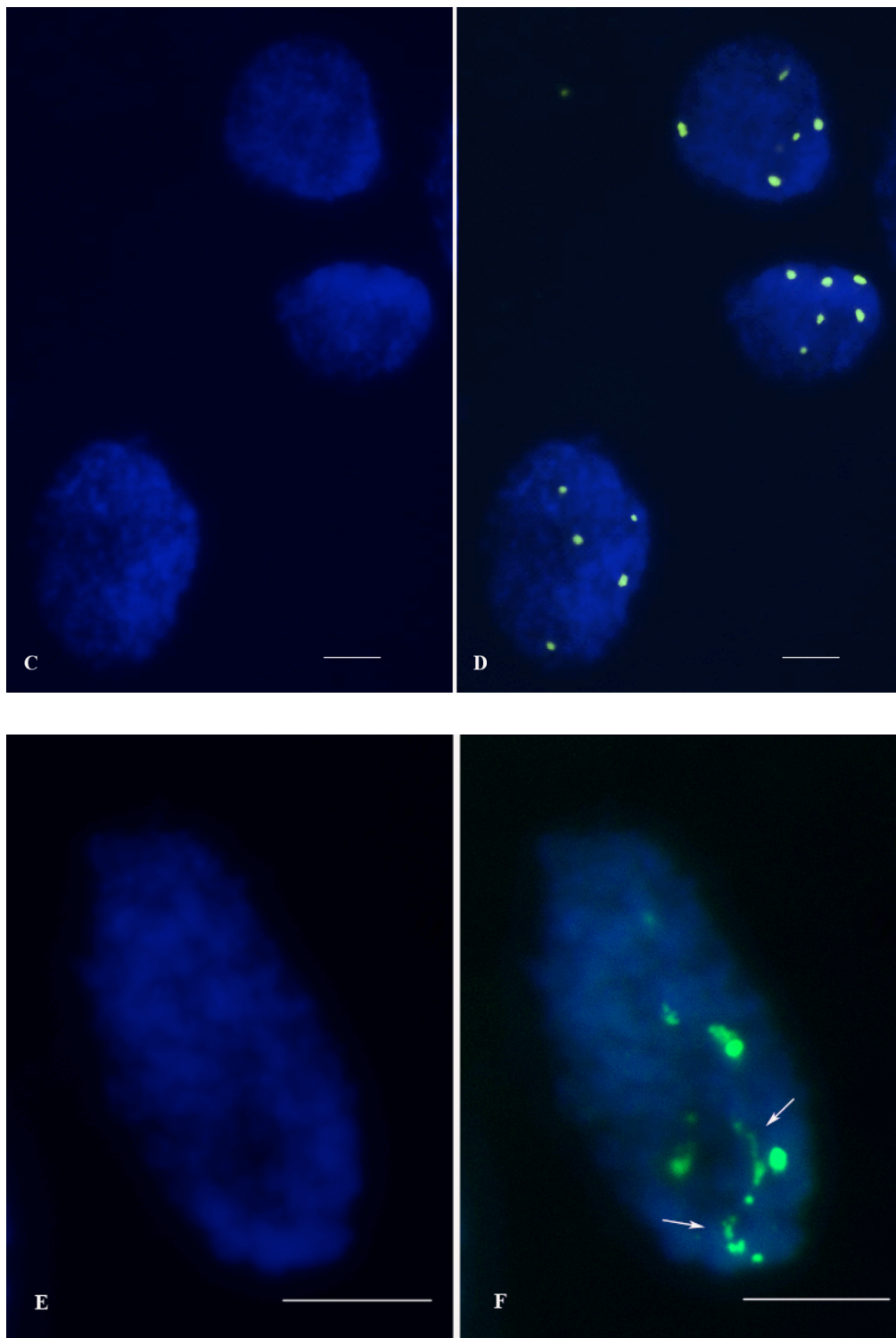


Figura 1. Células de *A. sativa* 2424. **(A)** Célula metafásica com coloração DAPI; **(B)** Marcação dos NORs (cada par representado por uma cor) com sonda pTa71; **(C)** Núcleos interfásicos com coloração DAPI; **(D)** Marcação dos NORs com sonda pTa71; **(E)** Núcleo interfásico com coloração DAPI; **(F)** Marcações *in situ* condensadas e descondensadas (setas brancas) com sonda pTa71. Barra = 8 μ m.

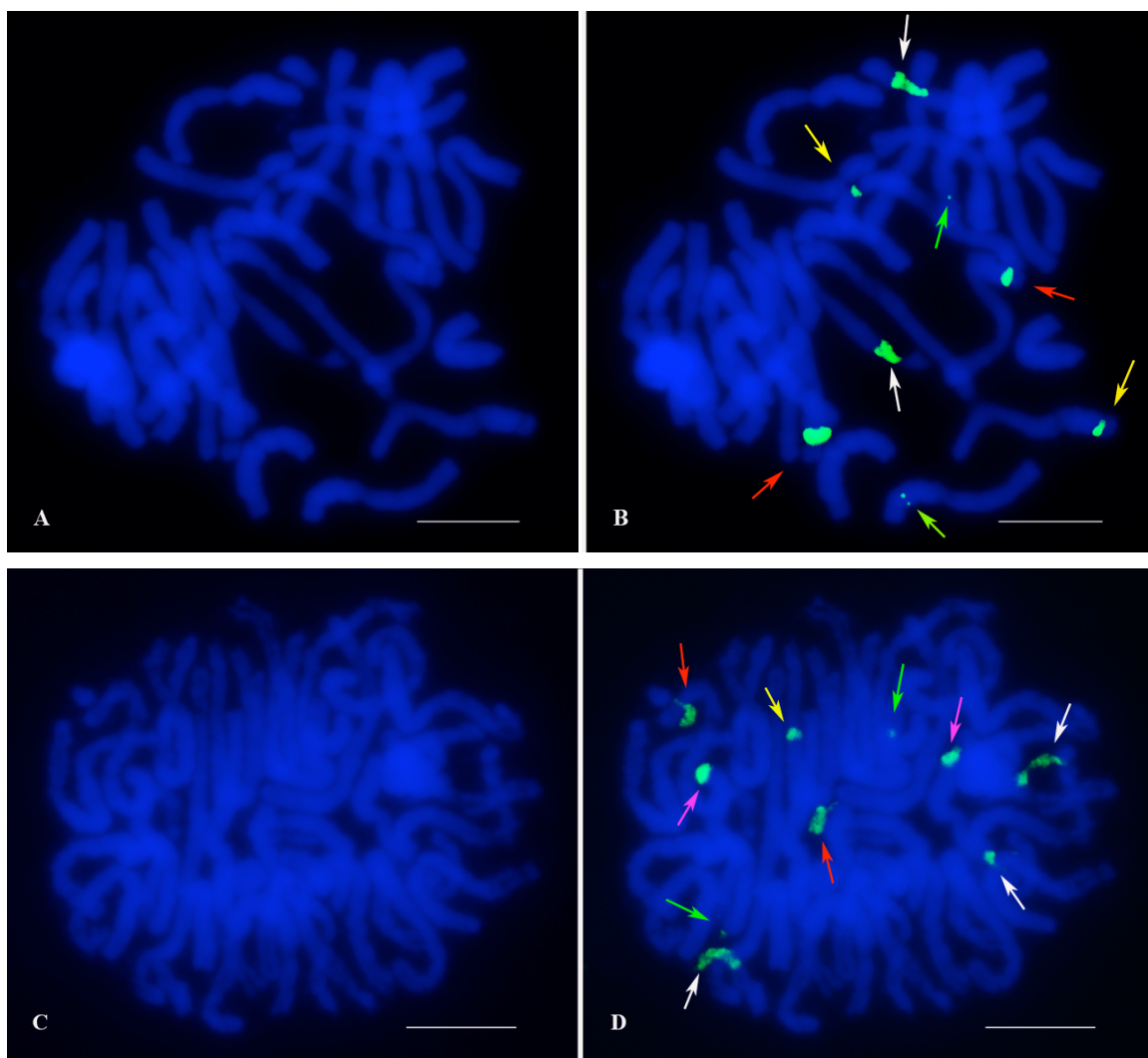


Figura 2. Células de *A. sterilis*. **(A)** Célula metafásica com coloração DAPI; **(B)** Marcação dos NORs (cada par representado por uma cor) com pTa71; **(C)** Célula prometáfásica com coloração DAPI; **(D)** Marcação dos NORs (cada par representado por uma cor) com pTa71. Barra = 8 μ m.

3.2 Análise molecular - IRAP e REMAP

Para testar se as técnicas de IRAP e REMAP constituem técnicas eficientes para identificar diferentes espécies de *Avena*, analisaram-se padrões de bandejamento obtidos a partir da utilização dos *primers* anteriormente descritos. Uma vez que estas técnicas se mostraram eficientes para a referida análise, foram utilizadas para efectuar a caracterização molecular de diferentes espécies do género *Avena* assim como para avaliar eventuais rearranjos genómicos resultantes do cruzamento das espécies *A. sativa* x *A. sterilis*.

Na realização das técnicas IRAP e REMAP foram utilizados DNA extraídos de dois indivíduos de *A. sativa* S. Eulália, dois de *A. sativa* 2424, dois de *A. sterilis* e três de *A. sativa* x *A. sterilis*. Desta forma, é possível avaliar comparativamente os perfis de bandas obtidos em diferentes indivíduos da mesma espécie e entre diferentes espécies. Apenas as bandas entre os 200 e os 1650 pb foram contabilizadas, uma vez que estas regiões dos géis produziram padrões de maior qualidade, permitindo

uma mais fácil discriminação das bandas. Os padrões de bandejamento dos genomas das várias espécies obtidas a partir do IRAP e REMAP são apresentados na Figura 3, e os respectivos resultados encontram-se sumarizados na Tabela 3.

Os perfis de bandejamento obtidos apresentam um número considerável de bandas distintas em todas as espécies e para todas as combinações de *primers* analisadas, o que permitiu efectuar uma análise comparativa dos resultados obtidos, tendo por base o número total de bandas por espécie, o número de bandas monomórficas - presentes nos dois genótipos - e o número de bandas polimórficas - observado apenas em um dos genótipos: polimórficas intraespecíficas entre as duas linhas de *A. sativa* estudadas (2424 e S. Eulália, Tabela 3A); e polimórficas interespecíficas entre as espécies *A. sativa* linha 2424 e *A. sterilis* (Tabela 3B).

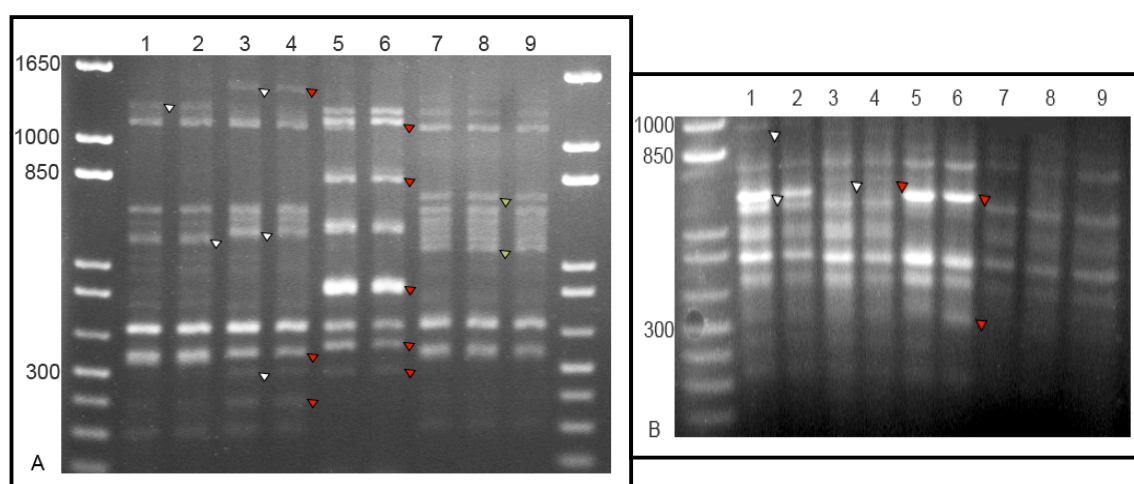


Figura 3. (A) Padrões de bandejamento IRAP obtidos com *primer Nikita*. **(B)** Padrões de bandejamento REMAP obtidos com a combinação de *primers Nikita + (GT9)C*. **1 e 2)** *A.sativa* S. Eulália; **3 e 4)** *A.sativa* 2424; **5 e 6)** *A. sterilis*; **7, 8 e 9)** Híbrido.

Setas brancas: bandas monomórficas entre *A. sativa* 2424 e S. Eulália; **Setas vermelhas:** bandas dos parentais ausentes no híbrido; **Setas verdes:** bandas novas exclusivas do híbrido.

Tabela 3. (A) Análise dos perfis de bandas obtidos com IRAP e REMAP em *A. sativa* 2424 e *A. sativa* S. Eulália. **(B)** Análise dos perfis de bandas obtidos com IRAP e REMAP nas espécies parentais e no seu híbrido.

- [i] Bandas monomórficas intraespecíficas: comuns em ambas as linhas de *A. sativa* (S. Eulália e 2424);
[ii] Bandas polimórficas intraespecíficas: observadas apenas numa das linhas de *A. sativa*.

(A) <i>Primers</i>	IRAP (<i>Nikita</i>)	REMAP (<i>Nikita + (GT9)C</i>)	Total
<i>A. sativa</i> S. Eulália	9	7	16
<i>A. sativa</i> linha 2424	10	6	16
• Monomórficas[i]	7	5	12 (60%)
• Polimórficas[ii]	5	3	8 (40%)

- [i] Bandas monomórficas interespecíficas: comuns em ambas as espécies parentais (*A. sativa* e *A. sterilis*);
 [ii] Bandas polimórficas interespecíficas: observadas apenas numa das espécies parentais;
 [iii] Bandas esperadas no genótipo híbrido: bandas que se espera observar, resultado de um perfil aditivo das bandas características de ambas as espécies parentais;
 [iv] Bandas conservadas no genótipo híbrido: bandas parentais mantidas;
 [v] Bandas rearranjadas no genótipo híbrido: bandas parentais ausentes no híbrido e novas bandas observadas exclusivamente no híbrido.

(B) Primers	IRAP (<i>Nikita</i>)	REMAP (<i>Nikita</i> + (GT9)C	Total
<i>A. sativa</i> linha 2424	10	6	16
<i>A. sterilis</i>	9	5	14
• Monomórficas [i]	3	3	6 (37%)
• Polimórficas [ii]	6	4	10 (63%)
Híbrido			
• Esperadas [iii]	16	8	24
• Conservadas [iv]	8	5	13 (54%)
• Observadas	11	5	16
Total rearranjadas [v]	10	3	13
Eliminadas de <i>A. sativa</i>	3	1	4 (31%)
Eliminadas de <i>A. sterilis</i>	5	2	7 (54%)
Novas	2	0	2 (15%)

A análise do perfil de bandas obtido nas linhas S. Eulália e 2424 de *A. sativa* com IRAP e REMAP, resumida na Tabela 3A, permitiu estimar um número de bandas polimórficas intraespecíficas de 40% (8 em 20 bandas observadas, Figura 3A e B – setas brancas). Ao mesmo tempo, a intensidade das bandas monomórficas não difere substancialmente entre os perfis de bandas obtidos para *A. sativa* S. Eulália e 2424.

Na Tabela 3B, é possível efectuar comparações entre espécies diferentes. O número de bandas polimórficas entre as duas espécies parentais do híbrido – *A. sativa* e *A. sterilis* – para as duas técnicas utilizadas é de 10 num total de 16, o que dá um resultado de 63% de polimorfismo.

A avaliação de três diferentes indivíduos do híbrido *A. sativa* x *A. sterilis* utilizando tanto IRAP como REMAP indicam que estas plantas híbridas são igualmente estáveis para os marcadores moleculares seleccionados (Figura 3A e B - 7, 8 e 9). Por outro lado, apesar de se esperar no híbrido um perfil de bandas aditivo dos perfis obtidos nas espécies parentais, observam-se claramente alterações no perfil de bandas do híbrido comparativamente com os genomas parentais, como eliminação de bandas observadas nas espécies parentais e aparecimento no híbrido de bandas novas que não são observadas em nenhuma das espécies parentais. Para avaliar a frequência de rearranjos no genoma do híbrido, o número de bandas polimórficas interespecíficas parentais foi adicionado ao número de bandas monomórficas (contabilizadas apenas uma vez), e o resultado foi comparado com o número de bandas observadas nos perfis do híbrido. Desta forma, seria expectável observar num perfil de bandas aditivo

um total de 24 bandas, embora apenas sejam detectadas 16 bandas, dentro das quais 13 são conservadas. Assim, apenas 54% de bandas detectadas nos genomas parentais se encontram conservadas no híbrido. Globalmente, um total de 85% de bandas rearranjadas no híbrido resulta da eliminação de bandas, mais frequente nas bandas providas da *A. sterilis*, e 15% de aparecimento de novas bandas. As bandas rearranjadas no híbrido resultam de 31% de bandas de *A. sativa* eliminadas (4 bandas num total de 13 bandas rearranjadas, Figura 3 – setas vermelhas, 4), de 54% de bandas de *A. sterilis* eliminadas (7 bandas em 13, Figura 3 – setas vermelhas, 6) e do aparecimento de 2 novas bandas em 13 (Figura 3A – setas verdes), que não são observadas nos perfis de bandas dos genomas parentais.

4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Com o objectivo de estudar comparativamente diferentes espécies do género *Avena*, englobando duas espécies parentais e uma espécie híbrido resultante desse cruzamento, utilizaram-se técnicas de hibridação *in situ* para uma análise citogenética e técnicas IRAP e REMAP para uma análise molecular. Pretendeu-se estudar os genes de DNA ribossomal nas diferentes espécies analisadas, assim como realizar a sua caracterização genómica envolvendo microsatélites e retrotransposições.

A análise da distribuição e organização das sequências de rDNA 45S é importante para entender acontecimentos de divergência e hibridação entre espécies. Estas sequências encontram-se localizadas em regiões específicas do genoma, denominadas NORs. Para detectar estas regiões, recorreu-se à técnica FISH com a sonda de rDNA 45S pTa71 tornando-se possível confirmar a presença de seis sinais de *in situ* grandes na linha de *A. sativa* 2424 em células metafásicas, tal como anteriormente descrito por Linares *et al* (1996) e Irigoyen *et al* (2002) para outras linhas desta espécie.

Relativamente à organização interfásica do rDNA, que nunca tinha sido avaliada em *A. sativa*, a detecção de 5 a 6 sinais condensados *in situ* na maioria dos núcleos observados sugere que cada NOR mantém em interfase uma região condensada que corresponderá provavelmente à fracção de genes transcricionalmente inactivos. Esta observação evidencia que os NORs em *A. sativa* apresentam maioritariamente um padrão de organização semelhante ao observado em centeio (Caperta *et al*, 2002), no qual cada NOR é composto por uma região condensada inactiva e uma região descondensada e transcricionalmente activa. Estas regiões descondensadas foram claramente observadas em alguns núcleos interfásicos.

Em *A. sterilis*, também foram detectados 6 NORs grandes em células metafásicas. No entanto, a observação de células prometafásicas permitiu identificar um par de NORs adicional de menores dimensões. De facto, a observação de cromossomas prometafásicos permite usualmente uma observação mais detalhada dos sinais *in situ*, o que pode permitir a detecção de sinais adicionais de rDNA. Pares adicionais de NORs relativamente aos localizados nos cromossomas já tinham sido igualmente observados em algumas células de *A. sativa* por Linares *et al* (1996). Os resultados obtidos em células

metafásicas e prometafásicas de *A. sterilis* parecem assim indicar que o número de NORs presente nesta espécie, que ainda não se encontra descrito, é superior ao observado na espécie cultivada *A. sativa*.

Relativamente ao estudo da conformação interfásica dos NORs em *A. sterilis*, ainda não foi possível obter núcleos interfásicos marcados com hibridação *in situ* com a qualidade necessária para caracterizar os padrões de organização do rDNA. No entanto, a observação de células prometafásicas permite sugerir que os NORs de *A. sterilis* apresentam uma organização que engloba uma zona condensada mais próxima do centrómero que a zona descondensada, padrão de organização semelhante ao anteriormente descrito em centeio (Caperta *et al*, 2002).

Os retrotransposões são elementos móveis e voláteis do genoma, que respondem a diversas situações de stress, enquanto os microsátélites são regiões do genoma altamente repetitivas e conservadas, contribuindo ambos para o estudo da proximidade filogenética dentro de uma espécie, e entre diferentes espécies de triticeae (Bento *et al* 2008). Assim, os marcadores moleculares IRAP e REMAP foram utilizados para demonstrar a ocorrência de reestruturações genómicas em *tritcale* (híbrido trigo x centeio) e linhas de trigo com a adição de cromossomas de centeio (Bento *et al* 2008).

A utilização de duas linhagens de *A. sativa*, uma de *A. sterilis* e uma do híbrido, na realização das técnicas IRAP e REMAP, permitiu avaliar comparativamente os perfis de bandas obtidos em diferentes indivíduos da mesma espécie e entre diferentes espécies.

A análise dos resultados obtidos permite observar que não são obtidas diferenças entre os padrões de bandejamento dos diferentes indivíduos da mesma espécie / linha analisados, tendo sido detectada apenas uma exceção, relativamente aos indivíduos de *A. sterilis* analisados, uma vez que uma banda (com cerca de 1200bp) é observada apenas em um dos indivíduos desta espécie. Este resultado pode estar relacionado com o facto de esta espécie ser uma espécie selvagem, podendo apresentar por isso uma maior diversidade genómica. Por outro lado, a análise dos padrões de bandejamento entre dois indivíduos da mesma espécie, mas de linhagens diferentes (*A. sativa* 2424 e *A. sativa* S. Eulália), permitiu identificar um total de 40% de bandas polimórficas intraespecíficas entre as duas, sugerindo que estas duas técnicas também são eficientes na distinção de variabilidade genómica intraespecífica. No entanto, a intensidade das bandas monomórficas não difere substancialmente entre os perfis de bandas obtidos para *A. sativa* S. Eulália e 2424, sugerindo que tanto o número de *loci* amplificados como as repetições em cada *locus* são conservados nas duas linhas analisadas.

Por outro lado, a avaliação da diversidade genómica interespecífica revelou um total de 63% de bandas polimórficas entre *A. sativa* e *A. sterilis*, o que demonstra que as técnicas de IRAP e REMAP são excelentes ferramentas para caracterizar diferentes espécies do género *Avena*, e confirma que estas duas espécies apresentam uma divergência filogenética considerável, como sugerido por Loskutov (2008). Estes resultados corroboram a grande utilidade destes marcadores moleculares na identificação

de divergência interespecífica, como anteriormente sugerido por Bento *et al* (2008) em trigo, centeio e triticale.

A avaliação de três diferentes indivíduos do híbrido *A. sativa* x *A. sterilis* utilizando tanto IRAP como REMAP indicam que estas plantas híbridas são igualmente estáveis para os marcadores moleculares seleccionados. No entanto, os perfis de bandas aditivos dos perfis obtidos nas espécies parentais expectáveis no genótipo híbrido não foram observados. De facto, observam-se claramente alterações no perfil de bandas do híbrido comparativamente com os genomas parentais, como eliminação de bandas observadas nas espécies parentais e aparecimento no híbrido de bandas novas que não são observadas em nenhuma das espécies parentais. Assim, observou-se um total de 85% de rearranjos genómicos no híbrido, dos quais 15% correspondem ao aparecimento de novas bandas. Deste modo, podemos concluir que o desaparecimento de bandas providas dos parentais é muito mais frequente que o aparecimento de novas bandas, tal como observados em estudos realizados anteriormente em genótipos híbridos de cereais (Bento *et al*, 2008, Bento *et al*, 2011).

Por outro lado, Bento *et al* (2011), propõem que a espécie parental do híbrido/poliplóide com o genoma de maior dimensão é o que sofre maior nível de reestruturações genómicas. Tal é reforçado também neste estudo, uma vez que se observa que a espécie que sofre mais alterações genómicas (eliminação de bandas no híbrido) é a *A. sterilis*, com 54% de bandas eliminadas e um maior tamanho do genoma (1C = 13,65 pg), em comparação à *A. sativa* que apresenta 31% de bandas eliminadas e possui um genoma mais pequeno (1C = 13,23 pg) (Bennett & Smith, 1976).

Os resultados apresentados neste trabalho permitem demonstrar claramente que os referidos marcadores moleculares não só são excelentes ferramentas para efectuar a caracterização genómica de diferentes espécies também do género *Avena*, com a apresentação de padrões de bandejamento bastante estáveis, permitindo igualmente avaliar a ocorrência de reestruturações genómicas em híbridos *A. sativa* x *A. sterilis*, como demonstrado pela primeira vez neste trabalho. Sendo que são igualmente observadas diferenças consistentes entre as duas linhas de *A. sativa* analisadas, estes marcadores moleculares podem ser também utilizados para identificação de diferentes linhas de uma mesma espécie de *Avena*.

Os resultados obtidos em termos de reestruturações genómicas detectados no genótipo híbrido serão futuramente confirmados em ecotipos do híbrido e das espécies parentais provenientes da mesma localização geográfica. Na verdade, apenas a linha de *A. sativa* e o híbrido analisados provêm da mesma localização geográfica (Ilha da Madeira), enquanto a linha de *A. sterilis*, tem uma proveniência geográfica distinta (Elvas). Assim, apesar deste híbrido ter ocorrido naturalmente de uma forma espontânea, pode não resultar exactamente das linhagens parentais estudadas. Deste modo, é nosso objectivo proceder futuramente à mesma análise com indivíduos das duas espécies parentais e do híbrido da mesma proveniência, que já foram colhidas na “Eira Velha” do Instituto Superior de Agronomia e devidamente identificadas pelo Engº José Carlso Costa, para confirmar os resultados apresentados neste trabalho.

Serão também realizados cruzamentos sintéticos, para uma análise mais controlada dos rearranjos genômicos detectados, e a análise molecular das diferentes espécies de *Avena* e do genótipo híbrido incluirá igualmente a caracterização das sequências intergênicas dos genes ribossomais 45S o que permitirá igualmente estabelecer correlações entre os dados obtidos através dos estudos citogenético e molecular. Esta análise pode ser enriquecedora uma vez que as regiões intergênicas do rDNA 45S, são regiões que apresentam grande diversidade genômica entre as espécies.

A caracterização genômica das diferentes espécies de *Avena* e a detecção de rearranjos genômicos no híbrido será futuramente enriquecida pela realização de FISH com utilização das sondas de rDNA 5S (sonda pTa794), assim como as sondas pAs120a e pAm1, que são sequências repetitivas que permitem detectar os genomas A e C, respectivamente, que foram gentilmente cedidas por A. Fominaya (University of Alcalá, Madrid).

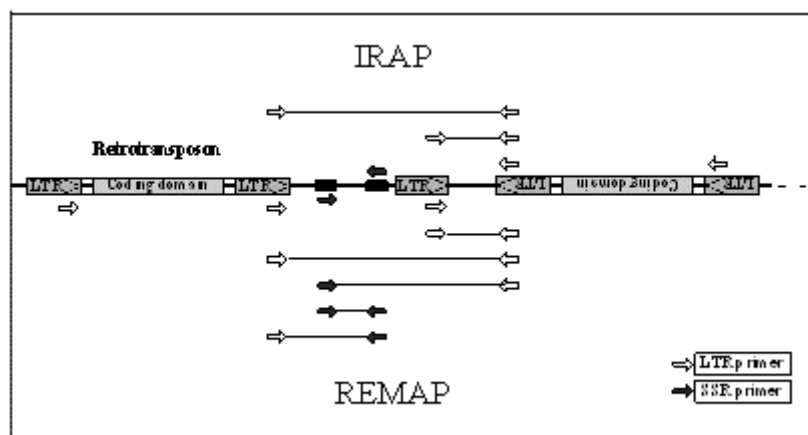
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **Adams, S.E., Mellor, J., Gull, K., Sim, R.B., Tuite, M.F., Kingsman, S.M., Kingsman, A.J.** (1987). The functions and relationships of Ty-VLP proteins in yeast reflect those of mammalian retroviral proteins. *Cell* 49: 111-119;
- **Bennett, M., Smith, J.** (1976). Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 274: 227- 274;
- **Bento, M., Pereira, S., Rocheta, M., Gustafson, P., Viegas, W., Silva, M.** (2008). Polyploidization as a Retraction Force in Plant Genome Evolution: Sequence Rearrangements in Triticale. *Polyploid Genome Evolution*, Issue 1, e1402;
- **Bento, M., Gustafson, J., Viegas, W., Silva, M.** (2011). Size matters in Triticeae polyploids: larger genomes have higher remodeling. *Genome* 54: 175–183;
- **Caperta, A., Neves, N., Morais-Cecílio, L., Malhó, R., Viegas, W.** (2002). *Journal of Cell Science* 115: 2839-2846;
- **Chen, Z.J., Ni, Z.** (2006). Mechanisms of genomic rearrangements and gene expression changes in plant polyploids. *BioEssays*, 28: 240-252;
- **Clayton, W.P., Renvoize, S.A.** (1986). *Genera graminum grasses of the world*. London: Royal Botanic Gardens, 13: 389p. *cit in* **Tavares, M., Zanettini, M., Carvalho, F.** (1993). Origem e Evolução do Género *Avena*: suas implicações no melhoramento genético. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 28, n.4: 499-507 ;
- **Coffman, F.A.** (1977). *Oat History, Identification and Classification*. USDA-ARS, Washington, 3p.;
- **Costa, J., Balsinhas, A., Cabral, F., Moreira, I.** (2000). Distribuição e Diferenciação Isoenzimática de Táxones do Género *Avena* L. *Portugaliae Acta Biol*, 19: 373-386;
- **Gerlach, W.L., Bedbrook, J.R.** (1979). Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Research* 7: 1869-1885;
- **Gerlach, W.L., Dyer, T.A.** (1980). Sequence organization of the repeated units in the nucleus of wheat which contain 5s-rRNA genes. *Nucleic Acids Research* 8: 4851-4865;
- **Harding, R.M., Boyce, A.J., Clegg, J.B.,** (1992). The evolution of tandemly repetitive DNA:

Recombination rules. *Genetics*, 132: 847-859;

- **Holden, J.** (1979). Oats. *Avena* spp. (Gramineae – Aveneae). In Simmonds, N. W. (Ed.). *Evolution of crop plants*. New York: Longman, 339p.;
- **Irigoyen, M.L., Linares, C., Ferrer, E., Fominaya, A.** (2002). Fluorescence *in situ* hybridization mapping of *Avena sativa* L. cv. SunII and its monosomic lines using cloned repetitive DNA sequences. *Genome* 45: 1230–1237;
- **Kalendar, R., Grob, T., Regina, M., Suoniemi, A., Schulman, A.,** (1999). IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theor Appl Genet* 98: 704-711;
- **Katsiotis, A., Loukas, M., Heslop-Harrison, J.** (2000). Repetitive DNA, Genome and Species Relationships in *Avena* and *Arrhenatherum* (Poaceae). *Annals of Botany* 86: 1135-1142;
- **Linares, C., Gonzalez, J., Ferrer, E., Fominaya, A.** (1996). The use of double fluorescence *in situ* hybridization to physically map the positions of 5s rDNA genes in relation to the chromosomal location of 18s-5.8s-26s rDNA and a C genome specific DNA sequence in the genus *Avena*. *Genome* 130(2): 535-541;
- **Linares, C., Ferrer, E., Fominaya, A.** (1998). Discrimination of the closely related A and D genomes of the hexaploid oat *Avena sativa* L. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 12450-12455;
- **Linares, C., Irigoyen, M., Fominaya, A.** (2000). Identification of C-genome chromosomes involved in intergenomic translocations in *Avena sativa* L., using cloned repetitive DNA sequences. *Theor Appl Genet*, 100: 353-360;
- **Loskutov, I.** (2008). On evolutionary pathways of *Avena* species. *Genet Resour Crop Evol* 55: 211-220;
- **Miller, J., Dong, F., Jackson, S., Song, J., Jiang, J.,** (1998). Retrotransposon-Related DNA Sequences in the Centromeres of Grass Chromosomes. *Genetics* 150: 1615-1623;
- **Nishiyama, I., Yabuno, T., Taira, T.** (1989). Genomic affinity relationships in the genus *Avena*. *Plant Breeding* 102: 22-30;
- **Noletto, R., Vicari, M., Cipriano, R., Artoni, R., Cestari, M.,** (2006). Physical mapping of 5S and 45S rDNA *loci* in pufferfishes (Tetraodontiformes). Springer Science+Business Media B.V.;
- **Ranney, T.** (2006). Polyploidy: From Evolution to New Plant Development. Combined proceedings International Plant Propagators' Society 56: 137-140;
- **Roose, M.L., Gottlieb, L.D.** (1976). Genetic and biochemical consequences of poliploidy in *Tragopon*. *Evolution*, Lawrence 30: 818-830, *cit in* **Ranney, T.** (2006). Polyploidy: From Evolution to New Plant Development. Combined proceedings International Plant Propagators' Society 56: 137-140;
- **Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory;
- **Tavares, M., Zanettini, M., Carvalho, F.** (1993). Origem e Evolução do Gênero *Avena*: suas implicações no melhoramento genético. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 28, n.4: 499-507;
- **Viegas, W., Neves, N., Silva, M., Caperta, A., Morais-Cecílio, L.** (2002). Nucleolar dominance: a 'David and Goliath' chromatin imprinting process. *Cur Genomics*, 3: 563-576.

6. ANEXO 1



Anexo 1. Esquema representativo dos fragmentos amplificados por IRAP e REMAP (adaptado de Bento *et al.*, 2008).